

Válaszok Dr. Széll Márta opponensi véleményére

Tisztelt Professzor Asszony!

Nagyon köszönöm a dolgozatom alapos bírálatát és a feltett kérdéseket, amelyek érdekes, elgondolkodtató szempontokat vetettek fel és lehetőséget adtak arra, hogy új ötleteket kapjak a további kutatásokhoz.

I/1. kérdés:

47. és 49. oldal 2D elektroforézis képek: Minek tudható be, hogy egyes mólsúly tartományokban gyöngysorszerűen sorakoznak a különböző izoelektromos fókuszú fehérjék, míg bizonyos méret tartományokban teljesen üres a vízszintes sáv?

Válasz:

A kétdimenziós elektroforézis esetében a foltok eloszlása többé-kevésbé egyenletes, de attól függően, hogy milyen méretű és gradiensű gélt alkalmazunk, lehetnek itt is „üres” részek. Minél kisebb az alkalmazott gél mérete, annál kevésbé lehet „üres” részeket találni, sőt, akár az is előfordulhat, hogy az egyes foltok összecsúsznak, nem válnak el megfelelően egymástól. A legnagyobb méretű, 24 cm-es géleken, amilyenekkel mi is dolgoztunk, a fehérjék elválása jobb. Az egyenletes folteloszlás érdekében gradiens géleket javasolt alkalmazni, viszont a „házi” készítésű gélek gradiensének reprodukálhatósága alacsony, kereskedelmi forgalomban pedig csak kisméretű gradiens gélek kaphatók, amelyek feloldóképessége kisebb. Sajnos ebben az esetben ideális állapot nem létezik, és mindenképp kompromisszumot kell kötni. A hiba minimalizálása érdekében, munkánk során mi a 24 cm-es, 12% akrilamid tartalmú, nem gradiens géleket alkalmaztuk lemondva az egyenletes folteloszlásról.

A kétdimenziós elektroforézis során a poszttranszlációs módosításokat tartalmazó fehérje formák elválhatnak egymástól a második dimenzióban. Míg az N-glikoziláció és proteolízis eltérő méretet eredményez, vagy a lipid módosítások eltérő méretet és mobilitást okoznak (pl. LC3), más módosítások, mint a mono foszforiláció, metiláció, nitroziláció, acetiláció, citrullináció stb. nem okoznak olyan mértékű méretbeli módosulást, hogy a 2D gélen a változás jól látható legyen. Ezek a módosulatok általában a töltésük alapján fognak elválni egymástól az izoelektromos fókuszálás során jellegzetes, gyöngysor szerű elrendezést mutatva. Az egy fehérje eltérő, egymástól méretben nem jelentősen különböző, formáinak jelenléte az egyik magyarázat a gyöngysorszerűen sorakozó fehérjék jelenlétére.

I/2. kérdés:

53. oldal 2. bekezdés: Mit ért a Jelölt különböző proteoformák alatt? A IV. csoportba sorolt fehérjék különböző 2D gélelektroforézis foltokban tapasztalt eltérő viselkedésére adja ezt a magyarázatot a Jelölt.

Válasz:

A proteoformák fehérje módosulatok vagy fehérje formák. Ide tartoznak a fehérje izoformák, valamint az eltérő poszttranszlációs módosításokat tartalmazó formák. Ez tulajdonképpen egyetlen fehérje esetében is több tíz, bizonyos fehérjék esetében akár százas nagyságrendű fehérje változatot jelent (pl. hiszton kód).

A kétdimenziós elektroforézis óriási lehetőséget teremt az egyes proteoformák, vagy protein módosulatok vizsgálatára, ugyanis tömegspektrometriás vizsgálatokkal ritkán lehet egyszerűen azonosítani az egyes formákat. A komplex minták proteoforma keverékek, amelyekben eltérő mértékben vannak jelen a különböző poszttranszlációs módosításokat, vagy azok kombinációit tartalmazó fehérje formák. Speciális dúsítási eljárások közbeiktatásával lehet a kiválasztott formákat dúsítani, hogy vizsgálhatóvá váljanak tömegspektrométerrel, viszont így sokszor elveszítjük a kvantitatív adatokat, és csak a kiválasztottakról (dúsítottakról) szerezhetünk információt. A kétdimenziós elektroforézis alkalmazásával ezek a problémák kiküszöbölhetők, és a proteoformák vizsgálatára a technika kiválóan alkalmazható. Mivel a proteoformák eltérő fiziko-kémia tulajdonságokkal rendelkeznek, ez megmutatkozik az elektroforetikus mobilitásukban is, azt eredményezve, hogy ugyanazon fehérjét egymástól különálló, közelebbi, vagy távolabb elhelyezkedő foltban tudjuk detektálni.

II/1. kérdés:

A Jelölt a 25. oldalon a PVP pathomechanizmus kulcs aspektusaként a retina epidermális-mezenchimális átalakulási folyamatait nevesíti, az 59. oldalon azonban a folyamatok modellezésére egér szemben dispase kezelést alkalmaztak. Kérem, hogy adjon rövid magyarázatot arra, hogy a dispase kezelés a modell rágcsáló szemében hogyan váltja ki a PVP-re jellemző epidermális-mezenchimális átalakulást! A bőrgyógyászati kutatások során – amelyben én magam otthonosan mozgok - a dispase-t az epidermis és a dermis szétválasztására használjuk.

Válasz:

A diszpáz egy gyakran alkalmazott proteáz, amely az extracelluláris mátrix degradációját végzi, és elterjedten használják sejtek izolálására. Ugyanakkor a diszpáz-indukálta PVR egy elfogadott modell a PVR patomechanizmusának vizsgálatára. Jelenleg kevés információ áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a diszpáz pontosan hogyan, milyen mechanizmussal vezet a PVR megjelenéséhez. A diszpáz kezelés után általában szemvizsgálatokat végeznek a rágcsálókön, és a morfológiai elváltozások alapján állapítják meg a PVR-t (Frenzel és mtsai. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998). Molekuláris vizsgálatok azt mutatták, hogy a diszpáz injekció beadása után kb. 1 héttel a retina pigment epitel sejtek elveszítik kapcsolataikat és kb. 3 héten belül leválnak. Ez egy gyulladásos állapotot eredményez, indukálódik az apoptózis és a fibroblaszt-szerű sejtek vándorlása a retinába (Yoo és mtsai. Mol Vis. 2017). Ezen adatok tükrében igen valószínű, hogy a diszpáz nem közvetlenül indukálja a PVR-re jellemző epidermális-mezenchimális átalakulást, hanem közvetve. A jelentős szövetkárosodás beindítja a sebgyógyulási folyamatsort, amely epidermális-mezenchimális átalakulást, majd az epiretinális membrán megjelenését eredményezi a diszpáz-kezelt szemben. Ezt igazolja, hogy a gyulladásos folyamatok gátlása, a P anyag általi apoptózis és epidermális-mezenchimális átalakulás gátlás, valamint a barna algákból származó gyulladáscsökkentő fucoidan sikerrel alkalmazható a PVR terápiájában, legalábbis egér modellben (Yoo és mtsai. Mol Vis. 2017, Zhang és mtsai. Cell Physiol Biochem 2018).

II/2 kérdés:

A krisztallinokat a TG2 szubsztrátjaként írja le a Jelölt és a dolgozatban számos krisztallin altípust nevesít. A TG2 ubikviter módon keresztköti a krisztallinokat vagy van valamilyen mértékű specificitása?

Válasz:

A TG2 a fehérjékben levő Gln és Lys oldalláncokat ismeri fel, és ezek között képes keresztkötések létrehozására. Több krisztallin szerepel a TG2 szubsztrátok között (<http://genomics.dote.hu/mediawiki/index.php/Crystallin>); eddig a β B2, β B3, β A3 és α B krisztallinokat azonosították szubsztrátként. A TG2 specifikusan, csak meghatározott Gln és Lys oldalláncokat felismerve működik. Például a β A3 krisztallin esetében a 23-as vagy 24-es Gln-t és a 33-as Lys-t ismeri fel, viszont a β B2 és a β B3 krisztallin csak Gln donor szubsztrátként szolgál a Gln 9, ill. a Gln21-es aminosavak révén, az α B krisztallin pedig csak Lys donor szubsztrát (Lys 175). PhD tanulmányaim során végzett vizsgálataink alapján a TG2

előnyben részesíti a rendezetlen régiókban levő Gln, ill. Lys oldalláncokat és ezeket gyakrabban használja szubsztrátként, mint a fehérje más részein lévő, hasonló oldalláncokat (Csősz és mtsai. J Mol. Biol. 2008).

III/1 kérdés:

Van-e lehetőség a dermcidin fehérje ELISA-val történő mérésére? Jelölt azt írta, hogy a fehérje Western blottal való kvantitálása nem volt lehetséges, mert kifutott a 10% os akrilamid gélből.

Válasz:

Igen, rendelkezésre áll a dermcidin ELISA. Mi azért nem alkalmaztuk, mert egyrészt beállítottunk egy tömegspektrometriás módszert a dermcidin vizsgálatára, másrészt nem állt rendelkezésre elegendő minta a tömegspektrometriás és ELISA, vagy több ELISA vizsgálat kivitelezésére.

III/1 kérdés:

A 101. oldalon, a 27. ábrán a trabekulektómiát követő komplikációt mutató csoportban nagyobb gyakorisággal előforduló fehérjéket mutatja be, amelyek az ábra tanúbizonysága szerint azonban nem szerveződnek semmiféle hálózatba. Elvégezték-e a String analízist oly módon is, hogy az azonosított komponensekkel elsődlegesen interakcióban levő egyéb fehérjéket is beemelték, hiszen lehetséges, hogy az azonosított fehérjék másodlagos vagy harmadlagos módon mégis csak interakcióban vannak egymással?

Válasz:

Teljesen jogos felvetés: a hálózat rajzolásánál minden alkalommal döntést kell hozni, hogy pontosan mit vizsgálunk, mert előfordulhat, hogy az elsődleges, vagy másodlagos interaktorok figyelembe vételével megrajzolt hálózatok vizsgálatával más-más funkciók és interakciók kerülnek napvilágra. A hálózatvizsgálatnál csak a különbségnek adódó fehérjékre koncentráltam, de elvégeztem a vizsgálatot úgy is, hogy figyelembe vettem az elsődleges interaktorokat. Az így megrajzolt hálózat 56 elemet tartalmazott 4 klaszterbe rendezve (interleukinok klasztere, TNF-TRAF klaszter, FGF-FGFR klaszter és az IL17RE, IL1C, IL17RA-t tartalmazó klaszter), de az értelmes feldúsult biológiai funkciókat vizsgálva nem hozott új eredményt.

IV/1 kérdés:

A Jelölt a 120-121. oldalon ismerteti, hogy a tajvani kutatók eredményei szerint szignifikáns eltérést mutató rezisztin fehérje mennyiségi különbségét a hazai populációban nem tudták megerősíteni. Mennyire tartja reálisnak azt a magyarázatot, hogy a szájüreg mikrobiomjának az eltérései – amely a táplálkozási szokások eltérése miatt nagyon komoly populáció specifikus különbségeket mutathat - is hozzájárulhatnak a populáció specifikus eltérés meglétéhez?

Válasz:

A metagenomikai és metaproteomikai vizsgálatok a szájüreg mikrobiomjának jelentős különbségeit írták le különböző csoportok között pl. gyerekek és felnőttek (Burcham és mtsai. Sci Rep. 2020), ill. ugyanazon a területen élő, különböző etnikai csoportok (Premaraj és mtsai. Sci Rep. 2020) között. Más kutatások egy-, ill. kétpetéjű ikrek vizsgálatával azt találták, hogy nem a genetikai háttérnek, hanem a környezetnek van nagyobb szerepe a szájüregi mikrobiom diverzitásában (Mukherjee és mtsai. Microbiome 2021). Egy Spanyolországban végzett kutatás eredményei azt mutatták, hogy a szájhygiéné, a táplálkozási szokások, sőt még a csapvíz minősége is meghatározó a szájüregi baktériumflóra alakulásában (Willis és mtsai. Microbiome 2018).

Az egymástól távol eső földrajzi régiókban élők esetében az eltérő táplálkozási szokások, eltérő környezet, és eltérő etnikai háttér valószínűleg megmutatkozik a szájüreg baktérium összetételében is. Az eltérő baktérium flóra eltérő nyál fehérje mintázattal társul (Granato és mtsai., Biochimica et Biophysica Acta 2021, Grassl és mtsai. Genome Med 2016, Chen és mtsai. BMC Oral Health 2020), ezért előfordulhat, hogy a nyál biomarkerek általunk megfigyelt populáció-specifikussága mögött is ez a jelenség húzódik meg.

IV/1 kérdés:

Összességében mi a Jelölt meglátása a szájüreg mikrobiom és a nyál proteom lehetséges összefüggéseiről?

Válasz:

A nyálban levő kémiai barrier részeként az antimikrobiális és immunmodulátor fehérjék (AMP) felelősek a potenciális patogének elleni védelem biztosításában; az AMP koktél összetétele folyamatosan változik, és meghatározza azt, hogy milyen baktériumok telepedhetnek meg a szájüregben. A nyálfehérjék és a mikrobiom változásai közötti

összefüggéseket vizsgálva több kutatócsoport talált bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a nyálfehérjék és a szájüregi mikrobiom között korreláció áll fenn (Granato és mtsai., Biochimica et Biophysica Acta 2021, Grassl és mtsai. Genome Med 2016, Chen és mtsai. BMC Oral Health 2020). Az AMPk-et illetően több adat áll rendelkezésre, számos AMP esetében pl. lizozim, prolaktin-indukált fehérje stb. ismert az is, hogy melyik baktérium fajra fejt ki hatását, sőt sok esetben a hatásmechanizmusról is van információnk.

Ugyanakkor érdemes megjegyezni azt is, hogy a multiomikai vizsgálatokat végző kutatócsoportok általában vagy csak a proteomikai, vagy csak a mikrobiológiai eredményeket elemzik részletesen, a proteom-mikrobiom rendszerbiológiai szemléletű részletes vizsgálatát nem igazán végzik el.

V/I kérdés:

A Jelölt a bevezető gondolatokban utal arra, hogy a verejték bizonyos paramétereinek mérése számos humán kórképben - cisztás fibrózis, diabétesz – fontos diagnosztikai értékkel bír, saját munkát azonban nem mutat be arra vonatkozóan, hogy az általa végzett alap proteomikai mérések bármely humán kórképben biomarker azonosításhoz alapul szolgáltak volna. Történt-e ezzel kapcsolatosan előrelépés akár a saját munkacsoportjában, vagy más munkacsoport felhasználta-e az általuk mérteket ilyen irányú vizsgálataikban?

Válasz:

A vizsgálathoz csak egészséges önkéntesektől gyűjtött mintákat használtunk. A bemutatott vizsgálat esetében nem az volt a közvetlen cél, hogy betegség diagnosztizálására használjuk a verejtéket, hanem, hogy információt szerezzünk a verejték nagy mennyiségben előforduló fehérjeit illetően. Később, egy kutatás során gyűjtöttünk verejték mintákat cukorbetegségben szenvedő gyerekektől, viszont az akkor rendelkezésre álló 4000 QTRAP tömegspektrométer nem bizonyult kellően érzékenynek a nagyon kis mennyiségben rendelkezésre álló egyedi verejtékminták vizsgálatához. A jelenlegi tömegspektrometriás rendszerünk már kellőképpen érzékeny, habár a verejték analízisével így is csak kb. 50 fehérje (a különböző keratin formákon kívül 43 fehérje) azonosítható. Terveink között szerepel a korábbi gyűjtésből származó egyedi verejték minták vizsgálata és potenciális biomarkerek azonosítása.

A szakirodalomban már egyre több publikáció jelenik amely, amely a verejték fehérje összetételének változásával foglalkozik. A vér, könny, vizelet proteomikai analízisével szemben, a verejték analízisével viszonylag kevés adat áll rendelkezésre. Ez egyrészt annak

tudható be, hogy nincs egységesített mintagyűjtési protokoll, másrészt pedig a nagyon érzékeny tömegspektrometriás rendszerek, amelyek már az egyedi verejtékminták vizsgálatáról is információt tudnak adni, még csak mostanra váltak széles körben elérhetővé.

Úgy gondolom, hogy a következő években tanúi lehetünk egy információ-robbanásnak ezen a téren, hiszen a verejték vizsgálata óriási potenciált rejt, elsősorban a napjainkban oly divatos okos szenzorok (telefon, óra, karkötő) alkalmazása révén.

VI/1 kérdés:

Bírálatomat 2021. március 4-én, a COVID-19 pandémia harmadik hulláma miatti hazai lezárás bejelentésének napján fejezem be. Adódik a jelen szituációban legaktuálisabb kérdés: van-e tudomása arról a Jelöltnek, esetleg ők maguk részt vettek-e olyan vizsgálatban, amely a SARS-CoV-2 vírus által a megfertőzött gazdasejtben okozott proteomikai változásokat vizsgálta (vizsgálja?), majd azt követően a Jelölt által fejlesztett módszerrel (vagy valamely hasonlóval) analizálja?

Válasz:

Gyakorlatilag több fronton is folyik a vizsgálat e téren. Egyrészt kétdimenziós elektroforézis segítségével vizsgálni kívánjuk a SARS-CoV2 proteáz hasításának eredményét HEK 293 sejteken, interakciós partnereket keresünk proteomikai analízisek segítségével, valamint a proteomikai analízisek során kifejlesztett módszereket alkalmazni kívánjuk bizonyos kismolekulák szérumban levő mennyiségének vizsgálatára COVID-19-en átesett betegek esetében.

A vizsgálatok folyamatban vannak, ezek eredményéről még nem tudok érdemben beszámolni. Ugyanakkor az eddig tanultakat és a gyűjtött tapasztalatokat felhasználva történt a vizsgálatok megtervezése, kivitelezése, és most folyamatban van az eredmények kiértékelése.

Még egyszer köszönöm a feltett kérdéseket és a dolgozatom bírálatát!

Debrecen, 2021. május 31.

Tisztelettel,

Dr. Csősz Éva
jelölt